メタロアッセイ カドミウム測定 LS-MPR

（商品コード：CD01M）

取扱説明書

ver. 1.4　2012 年 2 月 9 日改訂

*本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用しないで下さい。
*右記 web 上に掲載しているプロトコールの最新版を確認のうえ操作して下さい。→http://ak-j.jp/

【測定原理】

本法は TMPyP とカドミウムとのキレート錯体形成による可視部の発色を観測し、試料中のカドミウム濃度を求めるものです。この錯体の波長 450nm の吸光度を測定することによりカドミウム濃度を求めることができます。本法はカドミウム定量メソッドを判断する場合の基本測定用キットとして構成されております。より精密に分析する場合は本マニュアル、及び弊社 web に紹介しているプロトコールを参照のうえ、目的に合わせてご活用下さい。

【カドミウム定量の意義】

カドミウムは-SH 基を含有するタンパク質に強く結合します。システインを 20 個有するメタロチオネイン（MT）は、カドミウムによってその発現が誘導されるので、カドミウムの蓄積により MT 濃度が増加します。MT に結合したカドミウムは細胞内では毒性を示さず、一方、遊離のカドミウムは強い毒性を示します。カドミウムの暴露を受けると、尿中 β_2-マイクログロブリンの上昇、尿中 N-アセチルグルコサミダーゼ活性が上昇するなど、腎臓の近位尿細管に強い障害が現れます。障害が進行すると、Fanconi 症候群となり、骨病変の症状が観察されます。現在のところ、カドミウムの生物学的な有用性は明瞭に見つかっていませんが、一部の海洋生物においてカドミウムを活性中心とする炭酸脱水素酵素の生成が報告されており、その生物学的機能についての探索研究が期待されます[3,4]。

【キットの内容】

A：基本メソッド合計 50 測定分（商品コード：CD01M）

		準　備
R-A 緩衝液	8.0 mL×1	そのまま使用して下さい
R-B 緩衝液	13 mL×1	そのまま使用して下さい
R-R キレート試液	0.2 mL×1	そのまま使用して下さい
R-EDTA 液	0.2 mL×1	そのまま使用して下さい
Cd 標準液 200 μg/dL	2.5 mL×1	そのまま使用して下さい

B：分離濃縮メソッド

溶出液（1.3M 硝酸）	別途調製して下さい
吸着液（0.1M 塩酸）	別途調製して下さい

*SAX カラムは添付されておりませんので別途、各社から市販されているものをお求めください

【測定試料の注意点】

1）試料を直接アッセイ検体とした場合は溶解性の無機カドミウム濃度として求められます。全カドミウム量を求める場合は有機物を分解（酸分解、灰化分解）したものを適用してください。
2）灰化試料等、高濃度の硝酸、塩酸を含む試料はあらかじめ、pH 2 以上に中和するか、希釈酸の濃度を 0.1M 以下にしてください。また、この場合は標準液、ブランク試料を希釈酸試料と同じものを別途調製しアッセイして下さい。
2）本法は、その得られる数値を保証するものではありません。応用される際は最適パラメータを試料種ごとに検討の上、ご使用されることをお奨め致します。

【オペレーション】

1．目的別プロトコール

更新・最新情報は弊社 website を参照してください。

◇スクリーニングや半定量の場合（基本メソッド）

○試料の準備

ライセート、その他生物試料の場合は 0.01M 硝酸に溶解し、遠心分離等により懸濁を除去しアッセイ検体とします。
*カドミウムイオンの解離挙動は試料種により異なるので抽出酸濃度、抽出時間等は試料ごとに最適化されることを推奨します。
*酸濃度を及び酸の種類を変えた場合は同様の酸組成で Cd 標準試料を調製しアッセイ検体として下さい。

灰化分解試料等の場合も同様に 0.01M 硝酸で希釈した試料としてアッセイ検体として下さい。
*希釈酸濃度を及び酸の種類を変えた場合は同様の酸組成で Cd 標準試料を調製しアッセイ検体として下さい。

○アッセイ

以下の用量と手順で R-A、R-B、R-EDTA、R-R、標準液、試料をウエル、セル等の清浄な容器へ分注して下さい。

添加順	μL	試薬ﾌﾞﾗﾝｸ	試料ﾌﾞﾗﾝｸ	Cd 標準試料	試 料
1	0.01M 硝酸（または希釈酸，精製水）	25	-	-	-
	Cd 標準液	-	-	25	-
	試 料	-	25	-	25
2	R-EDTA	-	2		
3	R-A	80	80	80	80
4	R-B	130	130	130	130
5	R-R	2	2	2	2
15 分静置後、450nm の吸光度を測定（測定条件詳細は次項“測定条件”を参照）					

*マトリクス条件によっては試料ﾌﾞﾗﾝｸの EDTA によるマスキングが不十分になる場合がありますので適宜増量して下さい。
*キット添付の標準液は 0.01M 硝酸溶液です。本系は硝酸濃度により吸光誤差を生むので、もし、これを変更する場合は試料と標準試料の酸組成が同一になるようにして下さい。

○濃度の算出

$OD_{試料}$：　試料の吸光度

$$\frac{OD_{試料} - OD_{試料ブランク}}{OD_{標準} - OD_{ブランク}} \times 200 = \text{Cd 濃度}(\mu g/dL)$$

標準液濃度

$OD_{試料ブランク}$：試料ﾌﾞﾗﾝｸの吸光度
$OD_{標準}$：　標準試料の吸光度
$OD_{ブランク}$：試薬ブランクの吸光度

*単位換算　μg/dL×0.089 = μmol/L

◇穀物、食品、生物組織抽出液等、マトリクスが複雑な試料の場合

○試薬の準備

1.3M 硝酸（溶出液）、0.1M 塩酸（吸着液）、SAX 樹脂ｽﾋﾟﾝｶﾗﾑ（例：ﾓﾉﾘｽｶﾗﾑ　ｼﾞｰｴﾙｻｲｴﾝｽ社製、他）、50～500 μg/dL カドミウム標準液（0.1M 塩酸溶解）

○試料処理プロトコール

試料溶液の調製

試料片を粉砕、細分　（カッター、ミル、乳鉢等）

↓

0.1M 塩酸に溶解　（例： 1g 片/ 5 mL 塩酸(0.1M)）

↓

所定時間ｼｪｰｶｰで撹動抽出　（例 10～60 分）

遠心分離 5,000 rpm 10 分

↓

上清を採取し試料とする　スピカラムによる分離濃縮操作へ

スピンカラムによる分離濃縮(5

SAX 樹脂製ｽﾋﾟﾝｶﾗﾑ
① 吸　着

Cd 標準液と試料の 600 μL を各々スピンカラムに添加する。
遠心分離　3,000～8,000 rpm, 10 分

② 洗　浄

200 μL の 0.1M 塩酸をｽﾋﾟﾝｶﾗﾑに添加する。
遠心分離　3,000～8,000 rpm, 10 分　室温

③ 溶　出

スピンカラムを回収用ﾁｭｰﾌﾞに付け替える
1.3M 硝酸をｽﾋﾟﾝｶﾗﾑに 200 μL 添加する
遠心分離　3,000～8,000 rpm, 10 分　室温

アッセイ検体

*パラメータは一例です。試料、目的に合わせて適宜、最適化して下さい。
*植物、食品中のカドミウムは 0.1M 塩酸で抽出、並びにカラムへ吸着させることが可能です。
*抽出に要する酸は 0.1M 塩酸をご使用下さい。他の酸では吸着効果が不完全になります。

○アッセイ

下記の用量で試薬ブランク（溶出液：1.3M 硝酸）、分離濃縮プロトコールにより調整された標準試料、試料に R-A、R-B、R-R を添加し室温 10 分間アッセイした後、下記条件で吸光度を測定して下さい。

（1 検体：約 230 μL 容量、アッセイ検体：試薬ﾌﾞﾗﾝｸ（1.3M 硝酸）、標準試料、試料）

	μL
アッセイ検体	25
R-A	25
R-B	180
R-R	3
15 分静置後、所定波長の吸光度を測定	

*ピペッティングにより泡が発生しないように丁寧に混合してください。泡が発生した場合はプレートミキサー等により除去してください。プレートミキサーのみによる混合、撹拌では再現性不良が発生する場合があります。
*標準液の濃度はカットオフ値、目的に合わせて、選択してください。100 μg/dL を超えると検量線が緩やかに曲線型となるので、1 点検量の場合は 20%程度の誤差となる場合があります。広いレンジ（50～500 μg/dL）における精密な定量をされる場合は多点検量線により濃度を求めることを推奨致します。100μg/dL をカットオフとしたスクリーニング検査試験の場合は一点検量での測定が可能です。

○濃度の算出

$$\frac{OD_{試料} - OD_{ブランク}}{OD_{標準} - OD_{ブランク}} \times 標準液濃度 = Cd\ 濃度(\mu g/dL)$$

$OD_{試料}$：試料の吸光度　$OD_{標準}$：標準試料の吸光度　$OD_{ブランク}$：試薬ブランクの吸光度

*単位換算 μg/dL×0.089 = μmol/L

*パラメータは一例です。試料、目的に合わせて最適化して下さい。

2．測定条件（全プロトコール共通）

測定条件（マイクロプレートリーダー・紫外可視分光光度計）

測光波長（主波長）	450 nm (吸収極大波長)
感度のある波長域	445～460 nm
測定温度	25～37℃
ウエル	96 穴ウエル or 分光測定用セル等

*紫外可視分光光度計を使用してキュベットで測定する場合、測定可能な検体数はマイクロプレートリーダー使用時と比較して少なくなります。ダウンサイズされた微量セルを使用することで 96 穴ウエルと同等の測定数を得ることも可能です。詳細については、弊社 website のサポート情報「紫外可視分光計　微量セル推奨品」を御参照下さい。微量セルはセルホルダーとのクリアランスの僅差による誤差、再現性の低下などが報告されています。使用時にはセルホルダーへ均一に装着されていることを十分に確認してください。
*タンパク質低吸着タイプのウエルを使用してください。

【主な仕様と性能】

感度	試薬をブランクとして 200 μg/dL のカドミウム標準液を測定した時の吸光度は 0.2～0.4 の範囲内です。
同時再現性	同一検体を 5 回測定した時の CV は 15%以内です。
正確性	原子吸光光度法による測定値の差は 20%以内です。
測定範囲	6～1,000 μg/dL 試料種により、10 μg/dL 以下の試料測定時に±1 μg/dL の誤差、及び擬陽性として正の誤差を与える場合があります。このレンジにおける数値を検定する場合は事前に試行し、正確性を確認して下さい。 SAX ｶﾗﾑ濃縮プロトコールを適用した場合、検出限界は 6 μg/dL です。 より低濃度領域を測定される場合はプロトコールの用量を変更し濃縮倍率を上げてください。
共存物質の参考許容範囲	半定量プロトコールの場合 Cd 濃度の 10 倍量（モル濃度）の Fe, Cu, Zn による測定値への影響は 15%以内です。 SAX カラム分離プロトコルの場合 Cd 濃度の 10 倍量（モル濃度）の Fe, Cu, Zn による測定値への影響は 5%以内です。

【品質保持期限と保存方法】

本品の品質保持期限は製造後 12 ヶ月です。（冷蔵 2～8℃）
開封後、冷暗所（2-8℃）で保存し、1 ヶ月以内に使用して下さい。

【参考文献】

1) 斎藤幹彦, 堀口大吉, 喜納兼勇, *分析化学*, 30, 635－639（1981）.
2) S. Igarashi, A. Manaka, M. Terunuma, M. Kaneki, *Analytical Letters*, 36, 11, 2393-2399 (2003)
3) T. W. Lane and F. M., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **97**, 4627-4631(2000)
4) T. W. Lane, *Nature*, **435**, 42 (2005)
5) Kunihiko Akatsuka et al, *Analytical Sciences* 1998, Vol.14, pp19

【製造販売業者】

AKJ グローバルテクノロジー 株式会社
千葉市中央区中央 4-5-1　Qiball 14F

※Metallogenics ™およびメタロジェニックス ™は、AKJ グローバルテクノロジー（株）の試薬販売ブランドです。
※メタロアッセイ ™は、AKJ グローバルテクノロジー（株）の 試薬キットの名称です。

【問い合わせ先】

AKJ グローバルテクノロジー株式会社　営業部
〒260-0013　千葉市中央区中央 4-5-1　Qiball 14F
TEL :　043-227-6767
FAX :　043-227-6768
e-mail :　sales@ak-j.com
URL:　http://ak-j.jp/

※ 取扱説明書、測定プロトコール等、製品に関する最新の情報は、下記弊社 website のサポートコーナーで御確認下さい。
http://ak-j.jp/
※ 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではございません。あらかじめご了承下さい。
※ 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダー、紫外可視分光光度計を用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承下さい。
※ 品質に関してのお問い合わせの際は、試薬キット包装袋に貼付の Lot No.を御確認の上、お問い合わせ下さい。
※ 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコールは、予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切に御使用下さい。
※ 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については、付属の製品安全データシート（MSDS）に従って下さい。